Labor. di Patologia gener. della R. Univ. di Bologna
diretto dal Prof. G. TIZZONI

Alcuni più recenti studî sull'immunità

(EHRLICH, EMMERICH)

Dottor EUGENIO CENTANNI, libero docente

(*Lavoro estratto dalla* RIFORMA MEDICA, *N. 109-110-111, Anno XV.*)

PALERMO
RIFORMA MEDICA
1899

Labor. di Patologia gener. della R. Univ. di Bologna
diretto dal Prof. G. TIZZONI

Alcuni più recenti studî sull'immunità

(EHRLICH, EMMERICH)

Dottor **EUGENIO CENTANNI**, libero docente

(*Lavoro estratto dalla* Riforma Medica, *N. 109-110-111, Anno XV.*)

PALERMO
Riforma Medica
1899

P. Ehrlich. Sulla valutazione del siero antidifterico e sulle sue basi teoretiche. (Die Werthbemessung des Diphterieheilserums und deren theoretische Grundlagen. *Klin. Jahrbuch*, VI Bd. 1897).

— Sulla costituzione del veleno difterico. (Ueber die Constitution des Diphteriegiftes. *Deut. med. Wochenschrift*, N. 38, Sept. 1898).

Emmerich e Löw. La causa della immunità artificiale e la guarigione delle malattie infettive. (Die Ursache der künstlichen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten. *Münch. med. Wochenschrift*, N. 40, Okt. 1898. Ref. Cbl. f. Bakt., Bd. XXV, Jan. 1899).

Credo utile richiamare l' attenzione sopra questi lavori pel contributo singolarissimo che essi portano alla dottrina dell'immunità, e un po' anche per la relazione che essi hanno con l'indirizzo delle mie ricerche. Le idee dell'Ehrlich hanno avuto una grande eco nel mondo scientifico, ma tutti si sono occupati, e non sempre a proposito, della parte che riguarda l'origine della antitossina nel corpo, che è la minore e la più ipotetica, laddove la parte che riguarda l'analisi dei principii attivi nelle culture, che è quella veramente interessante e tutta sperimentale, è passata finora quasi completamente sotto silenzio. Di questa parte noi ci occuperemo a preferenza, facendo precedere della prima quanto trovasi con essa strettamente collegato e le serve d'introduzione; seguiranno poi le esperienze di Emmerich e Löw, per finire colla rivendicazione di quanto spetta per diritto di precedenza ai miei lavori.

Origine dell'antitossina

Colla maggioranza degli scienziati, Ehrlich accetta l'opinione originaria del Behring, secondo la quale la sostanza immunizzante del siero sarebbe un prodotto della reazione dell'organismo, e da parte sua non si occupa che di spiegare il meccanismo con cui questa reazione si compie.

A questo proposito comincia dal richiamare quanto risultò in un suo precedente lavoro sul bisogno d'ossigeno nell'organismo, che cioè ogni protoplasma vivente si può considerare come costituito da due parti, una delle quali forma il centro funzionale, e l'altra, risultante di varie catene molecolari poste di fianco al centro stesso (Seitenketten, catene collaterali), ha uffici secondari,

diretti specialmente a mettere la parte funzionale in relazione cogli agenti esterni.

Ora, allorquando un veleno, ad esempio, il tetanico, viene introdotto nel corpo, arrivato che sia a contatto cogli elementi di sensibilità specifica — in questo caso, secondo Ehrlich, colle cellule nervose, — entra in combinazione con tali elementi, e precisamente colla molecola che costituisce la catena collaterale specifica, la Seitenkette, della cellula: le due molecole, del veleno e della cellula, si adattano e combaciano fra loro, come fa la chiave nella toppa, secondo il paragone di E. Fischer. A partire da questa combinazione colle Seitenketten, avvenuta nella parte più periferica e che ha formato la porta d'ingresso del veleno nella cellula, si sviluppa una serie di ulteriori e graduali reazioni molecolari, che arrivano infine ad influenzare le molecole interne del centro funzionale.

Risulta da questo che un veleno introdotto nel corpo deve traversare, per dispiegare i suoi effetti, tre stadi principali: 1°. libero in circolo e negli umori interstiziali; 2°. combinato colle Seitenketten delle cellule; 3° combinato col centro funzionale delle cellule stesse. Tanto nel 1° come nel 2° stadio la presenza del veleno nel corpo è affatto silenziosa; solo nel 3° stadio, quando si arriva ad alterare il centro funzionale, compaiono le manifestazioni morbose relative, — nel caso del tetano, l'ipereccitabilità e le contratture.

Si spiega per questa via il periodo di incubazione così caratteristico dei veleni infettivi, periodo il quale non è, come si crederebbe, dovuto solo al trovarsi il veleno ancora libero (1° stadio), ma invece, in gran parte, all'indugiarsi che fa il veleno stesso, in una combinazione silenziosa nell'interno degli elementi dei tessuti (2° stadio), come pel tetano hanno potuto calcolare Dönitz e Morgenroth.

Le catene collaterali unitesi al veleno costituiscono dei composti perduti per le cellule, che vengono eliminati e lasciano un difetto; ma, come nell'organismo vivente ogni difetto tende ad esser riparato colla produzione dell'identica sostanza, così anche in queste cellule col tempo di catene collaterali se ne viene riproducendo delle nuove al posto delle perdute. Seguitando ad iniettare veleno, come si fa per la ipervaccinazione sieroterapica, e quindi a distrugger Seitenketten e a stimolar ripetutamente le cellule a rifarne delle nuove, si finisce con la legge biologica generale, illustrata in questi ultimi tempi specialmente dagli studi del Weigert, che agli stimoli ripetuti l'organismo reagisce, non solo riparando il perduto, ma con un eccesso riparativo, con una ipertrofia. Ond'è che nelle cellule specifiche, — quelle dei centri nervosi pel tetano, — si viene a stabilire quasi una nuova funzione, per la quale le Seitenketten si riproducono in tal quantità, che, superando i bisogni cellulari, vengono espulse e passano negli umori e nel sangue.

Prendiamo ora un organismo intatto (Seitenketten fisse alle cellule) e uno ipervaccinato (Seitenketten libere nel sangue), ed introduciamo in entrambi una data quantità di tossina. Nell'organismo intatto — l'abbiamo detto or ora — il veleno aderisce alle Seitenketten cellulari, e per mezzo di esse raggiunge il centro

funzionale e promuove la malattia. Nell'organismo ipervaccinato, invece, il veleno viene a trovarsi di fronte alle Seitenketten già nel traversare il sistema circolatorio, e quivi si combina con esse; cosicchè il veleno, prima che arrivi alle Seitenketten delle cellule funzionanti, trovasi già, per rapporto ad esse, in istato di completa saturazione ed è spogliato perciò di ogni possibilità di nuocere.

L'ipotesi di Ehrlich può, adunque, in breve riassumersi: *La stessa sostanza del corpo vivente che, posta nelle cellule, determina l'avvelenamento, diventa invece causa di guarigione quando si trova circolante nel sangue* ». Seitenketten delle cellule e Seitenketten dei tessuti sono, in realtà, la stessa cosa, ma compiono un ufficio ben diverso in grazia appunto della loro posizione: potrebbe dirsi che le prime sono come le scolte che, cadendo, lasciano la porta aperta al nemico, invece le seconde assomigliano ai corpi avanzati che si sacrificano per coprire il nucleo migliore dell'armata.

Le Seitenketten circolanti, appunto per la loro funzione protettiva, hanno preso il nome di antitossina.

A questa teoria dell'Erhlich va legato un esperimento, fatto sotto la diretta ispirazione di essa e che suscitò non poca sorpresa, perchè rivestiva tutti i caratteri di una previsione geniale. Wassermann e Takaki trovarono che mescolando la poltiglia di sistema nervoso normale col veleno tetanico, si otteneva un prodotto che, iniettato negli animali sensibili, risultava completamente inattivo. Ciò che stava ad indicare esistere realmente nel sistema nervoso normale le Seintenketten capaci di combinarsi col veleno e di neutralizzarlo.

Le discussioni che si sono fatte pro e contro questa esperienza, e altre simili per diverse malattie, hanno un valore molto relativo, perchè non si può pretendere che fenomeni chimici così complessi e delicati si dispieghino, come durante la vita, in una morta poltiglia; aggiungasi a questo che per molti veleni — e anche il tetano è nel numero — gli elementi sensibili non sono sempre nel corpo nettamente determinati.

I TOSSOIDI *a)* LORO NATURA

Quando si fa una mescolanza in vitro di antitossina e veleno, avviene lo stesso che abbiamo poco fa veduto per l'incontro nel sangue circolante: antitossina e veleno si combinano e passano a prodotti inattivi, cosicchè, evitando ogni eccesso, il prodotto risultante è sprovvisto di qualsiasi effetto tossico, come di qualsiasi effetto immunizzante. Nella pratica però le cose non corrono così schematiche, per la ragione principale che siamo ben lungi dal possedere una tossina chimicamente pura: ciò che, con linguaggio comune, si chiama tossina, non è in realtà che brodo di coltura filtrato, una miscela, cioè, dove nuota tutto il complesso dei prodotti svariati di ricambio del batterio.

Ora, è accaduto che l'Ehrlich, occupandosi di stabilire una unità fissa di misura pel siero antidifterico nell'Istituto centrale di Steglitz, che egli dirige, pel controllo governativo dei sieri in Germania, è venuto a scoprire il fatto interessantissimo che, *dei prodotti della coltura difterica non è solo il veleno che fissa*

l' antitossina, ma ve ne ha un buon numero ancora fra i rimanenti. Lo stesso hanno confermato per la tossina tetanica Behring e Ransom *(Deut. med. Woch.*, marzo 1898).

Vediamo come si è venuti in chiaro di questo fatto. Il metodo stabilito dal Behring per dosare il siero antidifterico parte da un tipo, il siero normale: questo siero si ha quando alla dose di un cmc. neutralizza esattamente 100 dosi mortali di tossina difterica normale presa al 22° giorno di sviluppo nella stufa. È stato necessario stabilire questo termine convenzionale di sviluppo, perchè la costituzione chimica del brodo difterico è in movimento di variazione continua, tanto durante la cultura quanto durante la conservazione. Si sa infatti come la tossina conservata vada soggetta ad un progressivo indebolimento, variabile a seconda dei casi; cosicchè nello stesso volume di un cmc. si trovano col tempo diminuite le dosi mortali primitivamente contenutevi. Facendo invece l'esame del brodo prima delle tre settimane, durante il soggiorno nella stufa, si può in certi casi riscontrare in esso una tossicità maggiore.

Su 9 tossine conservate, di varia provenienza, esaminate dallo Ehrlich, la tossicità, in luogo delle 100 dosi mortali, oscillava fra un massimo di 96 a un minimo di 27,5. Nondimeno mescolando tossina indebolita e siero nelle stesse proporzioni volumetriche della tossina fresca, non riescì a a dimostrare nessun eccesso di sostanza immunizzante libera. Ciò vuol dire che la tossina scomponendosi ha lasciato altri composti, che, pur non esercitando nell'organismo animale alcun effetto tossico, conservano tuttavia la stessa affinità molecolare per l' antitossina, rispettivamente, per le Seitenketten di cui questa antitossina risulta formata.

Questi prodotti che fissano l'antitossina, prodotti atossici, ma provenienti da scomposizione della tossina, sono dall' Ehrlich stati distinti col nome di tossoidi.

Il fatto ora esposto ha fatto sorgere nell'Ehrlich l'idea che la molecola della tossina risulti di due parti: l' una l' *aptofora*, ha l'ufficio di far aderire la molecola tossica alla Seitenkette, sia dell' antitossina, sia degli elementi cellulari; l'altra, la *tossofora*, ha la proprietà, dopo che la parte aptofora le ha aperto l'adito alla cellula, di penetrare al centro funzionale e promuovervi le speciali alterazioni morbose. Di queste due semimolecole la più facilmente scomponibile è la tossofora; onde lasciando invecchiare la cultura o sottoponendola agli agenti fisici e chimici, l' aptofora è la parte che a prevalenza rimane e costituisce così il tossoide, l'elemento essenziale nella preparazione dei comuni vaccini dalle colture attenuate.

E si comprende facilmente come i tossoidi possano funzionare da vaccini, e da vaccini che agiscono, secondo l'esperienza di Ehrlich, «in modo facile e rapido». Introdotti essi nel corpo e penetrati a contatto degli elementi sensibili dei tessuti, si viene ancora ad avere di fronte, da una parte la semimolecola aptofora da cui risulta il tossoide, e dall' altra la Seitenkette degli elementi, e le due parti, ubbidendo alla reciproca affinità, si combineranno insieme. La combinazione avverrà senza alcun sintomo morboso, perchè l' altra parte della molecola tossica, la tossofora che è la veramente nociva, è giá stata distrutta dal processo di

attenuazione, e tutto si limiterà alle catene collaterali, restando completamente risparmiato il centro funzionante. Questa è la vaccinazione atossica o insensibile.

Introduciamo ora in questi organismi così vaccinati la molecola tossica intera, come si fa per la infezione di prova. Succederà che la Seitenkette cellulare, essendo già saturata con l'aptofora del vaccino tossoide, non potrà più combinarsi coll'aptofora stessa della molecola tossica intera successivamente introdotta; cosicchè la parte tossofora, che è velenosa solo nel caso che, per mezzo dell'aptofora, può penetrare entro la cellula, deve in questo caso rimanere necessariamente senza effetto.

I due modi, adunque, di conferire l'immunità, col siero e coi vaccini della coltura, hanno per base un unico processo chimico, la saturazione reciproca delle Seitenketten dei tessuti con la parte aptofora della molecola tossica. Ma nell'immunità data col vaccino la combinazione avviene nelle cellule, in quella col siero avviene in circolo; negli animali vaccinati il veleno introdotto non si combina affatto cogli elementi, perchè la Seitenkette cellulare è già saturata; negli animali trattati col siero il veleno, prima di raggiungere le Seitenketten cellulari, si esaurisce colle Seitenketten isolate introdotte in circolo col siero stesso. In entrambi i casi, quantunque per diverse vie, si raggiunge sempre l'identico scopo: impedire alla parte tossofora della molecola del veleno di penetrare fino al centro cellulare funzionante.

I tossoidi — *b*) Loro varietà

Approfondendo lo studio sulle proprietà dei tossoidi difterici, Ehrlich s'è potuto persuadere che i tossoidi della stessa cultura non si comportano tutti allo stesso modo.

Una prima differenza si ha nella *avidità diversa con cui questi prodotti, paragonati col veleno, attraggono e fissano l'antitossina*. Sotto questo rapporto si sono dovuti distinguere in *proto-tossoidi* che fissano l'antitossina più avidamente del veleno; in *sintossoidi*, in grado pari; in *epitossoidi*, in grado minore. In una classificazione ulteriore Ehrlich, eliminando gli epitossoidi che non appartengono propriamente a questa categoria e di cui diremo in seguito, ha diviso i tossoidi rimanenti più specialmente in *proto-tossoidi*, in *deutero-tossoidi* e in *trito-tossoidi*, caratterizzati pure dalla loro affinità in ordine decrescente per l'antitossina, e che provengono dalla scomposizione di altrettante varietà di tossina.

Questa diversa affinità per l'antitossina si rivela, in una mescolanza di vari tossoidi e tossina, col fatto che, fino a che non è saturata tutta la varietà superiore, l'antitossina non comincia ad essere assorbita dalla inferiore, e se la varietà inferiore ha già assorbito antitossina, la superiore, che poi vi venga aggiunta, gliela sottrae e lascia l'inferiore libera. Le cose succedono appunto come nella chimica comune, e si può paragonare, ad esempio, il prototossoide all'acido cloridrico e la tossina all'acido acetico, messi di fronte all'alcali, corrispondente all'antitossina.

Citiamo un esempio per dimostrare il sistema che ha tenuto Ehrlich per far l'analisi differenziale di questi prodotti. La

mescolanza esattamente neutralizzata di un cmc. di siero antidifterico normale con tossina difterica (100 dosi mortali originarie) è rappresentata dall'A. con Lo: questa stessa mescolanza più una dose mortale in eccesso, con L+ (Limite neutro e Limite mortale). Parrebbe naturalissimo che per salire da Lo a L+ bastasse aggiungere una sola dose mortale; invece ce ne vuole sempre di più, fino a 28 dosi negli esempi riportati dall'A. Ora perchè per avere una dose mortale in eccesso bisogna aggiungerne 28? Semplicemente perchè nella mescolanza Lo si contengono, fra gli altri prodotti, gli epitossoidi, già tutti saturati con antitossina; quando si aggiunge tossina per fare L+, la prima tossina stacca dall'epitossoide l'antitossina, colla quale ha maggiore affinità, e vi si combina in un prodotto neutro. Questo fino a 27 dosi mortali, rimanendo solo libera, a dar la morte all'animale, la 28ª dose, quando tutto l'epitossoide è liberato e di antitossina non resta che quella unita ai tossoidi più tenaci. Così 27 indica la dose di epitossoide contenuto nella mescolanza. Simili e più complicati sono i metodi di analisi per gli altri componenti.

La graduatoria dei tossoidi più sopra riportata ha condotto Ehrlich ad una conseguenza di estremo interesse, che, cioè, *nelle culture dei virus sono contenuti dei prodotti atossici, non solo vaccinanti, ma direttamente curativi*. (Giova ripetere che la cura, quando si parla di antitossine, non significa altro che esse sono capaci di neutralizzare il veleno già circolante e ancora libero; che, una volta il veleno penetrato nelle cellule, questo trattamento, conformemente alle ripetute prove sperimentali, non ha più influenza di sorta: si muore, per esempio, nella cura a tetano avanzato, nonostante il sangue sovraccarico di antitossina).

Per illustrare, adunque, le proprietà curative nei tossoidi bisogna scegliere la varietà più rapida, il prototossoide. Introdotto questo corpo quando il veleno è già circolante, protossoide e veleno verranno a trovarsi di fronte alle Seitenketten delle cellule sensibili. Essendo queste Seitenketten clinicamente le stesse dell'antitossina, la reazione dovrà succedere come nell'esempio poco fa riportato dalla chimica inorganica: le Seitenketten cellulari (alcali) si satureranno prima tutte col prototossoide (acido cloridrico), lasciando per ultima la tossina (acido acetico). Ma quando le Seitenketten cellulari sono saturate, abbiamo visto che il veleno non può più attecchire, ed ecco che la malattia dovrà arrestarsi al punto in cui l'iniezione di protossoide l'ha trovata.

Il simile, ma in minor grado, deve succedere con l'altra categoria di tossoidi, i sintossoidi. Lascisi dunque di credere che la proprietà curativa sia esclusiva dei sieri, e non piuttosto propria anche dei prodotti diretti della cultura, e di buona parte, quando sieno acconciamente preparati.

La seconda classificazione che Ehrlich ha fatto dei tossoidi, è quella che prende a base la *rapidità con cui essi si formano nelle colture e nel veleno conservato*. Stabilendo nel brodo di cultura una serie faticosa di esami, dal principio dello sviluppo a mesi ed anni dopo, Ehrlich ha potuto dimostrare che le tre varietà di tossoidi sopra enumerate, proto, deutero e trito-tossoidi, si presentano nelle culture in epoche variabili, ma sottoposte tuttavia a date leggi.

Singolare a questo riguardo è innanzi tutto il fatto che. in ognuna delle tre varietà di tossina, una metà (α) si scompone prima, quasi per tutte contemporaneamente, e un'altra metà (β) più tardi in epoche diverse. La modificazione α avviene per le tre tossine in gran parte durante le tre settimane di soggiorno alla stufa, cosicchè, qualche giorno dopo finita la cultura, si ha un momento, in cui della tossicità intera ($\alpha+\beta$) resta solo una metà, la modificazione β, da cui il nome di emitossina che la tossina prende in questo momento.

La modificazione residua β si scompone per le tre tossine nel seguente ordine: 1ª è la β-tritotossina, che può essere anche scomposta nella stufa; 2ª è la β-prototossina che si scompone nei primi mesi della conservazione del veleno; 3° la β-deuterotossina invece, sotto date condizioni, rimane indecomposta, e si deve ad essa se la tossicità del brodo difterico conservato, dopo una prima diminuzione, finisce per rendersi stabile.

Come si vede, il veleno difterico é lungi dal comportarsi come una unità chimica, tanto per rapporto all'avidità di fronte all'antitossina, quanto per la facilità con cui passa in tossoide sotto gli agenti attenuanti. In ogni caso bisogna tener ben presente che, in questo passaggio in tossoidi, le tossine non alterano minimamente il grado di affinità per l'antitossina che possedevano allo stato di piena attività: ciò che sta a confermare come l'attenuazione distrugga solo l'emimolecola tossofora, rispettando completamente quella aptofora.

I tossoni

Fin dai primi esami sui prodotti delle culture difteriche, che, pur essendo atossici, legavano l'antitossina, E h r l i c h aveva notato come una parte di essi comparisse precocemente entro la stufa, già ai primi giorni di cultura. Per l'idea radicata nella scuola tedesca che in una cultura il veleno e i suoi derivati sono tutto per dar l'immunità, l'A., ancora incerto se si trattasse di prodotti primari delle cellule batteriche, mise nella prima memoria questi prodotti precoci, anche essi, nella categoria dei tossoidi e precisamente degli epitossoidi. Nella seconda memoria però, vista la loro precocità di formazione di fronte al veleno, visto che successivamente non solo non si formavano, ma venivano scemando, viste le loro proprietà speciali, si è affrettato a separarli sostanzialmente dai tossoidi e farne una categoria a parte: i tossoni.

Sono i tossoni, adunque, prodotti atossici delle culture, non provenienti, come i tossoidi da decomposizione del veleno, ma rappresentanti un secreto primario del bacillo difterico, dotati, al pari dei tossoidi, della proprietà di fissare l'antitossina, quantunque, nel caso della difterite, con rapidità notevolmente minore di essi.

In sostanza, rappresentano un gruppo aptoforo, il quale, a differenza del gruppo simile dei tossoidi, non ha avuto mai legato il gruppo tossoforo ma si è presentato primitivamente come tale. Naturalmente questi tossoni sono anch'essi immunizzanti e innocui, perchè, come in vitro si combinano colla Seitenkette del siero, lo stesso fanno colla Seitenkette delle cellule e ne saturano l'affinità

contro il veleno intatto. Salvo l'origine, tutto avviene come pei tossoidi.

Ed ecco come con un prodotto diretto delle culture, un prodotto non tossico né stato mai tossico, si riesce a dare l' immunità passiva diretta.

Anche per i tossoni si comincia ad intravvedere che non sono, nemmeno essi, dei corpi unitari, ma che posseggono delle varietà simili a quelle dei tossoidi, per l'avidità di fronte all'antitossina, per la rapidità di formazione e scomposizione ecc. Su questo punto l' A. prepara nuove esperienze.

Nelle culture freschissime non si riscontra che tossina e tossoni; i tossoidi, come prodotti di scomposizione della tossina compaiono più tardi. Riguardo alla loro proporzione reciproca, Ehrlich ha trovato nel brodo difterico freschissimo che tossina e tossoni sono esattamente nello stesso rapporto quantitativo. E sempre una quantità forte, ma l'A. non nasconde che, migliorando le condizioni del substrato di cultura, questi prodotti debbano crescere di quantità e di potenza. Dice infatti:

« Nella immunizzazione naturale, in quella forma, cioé, in cui viene in giuoco non solo il veleno, ma lo stesso germe patogeno, probabilmente i tossoni, gli analoghi naturali dei tossoidi, debbono compiere un ufficio preponderante. I tossoidi non entrano in questo caso in questione, giacchè essi sono i prodotti di decomposizione del veleno già *formato*. Si deve anche immaginare che una parte dell'immunità artificiale, che si produce con l'introduzione contemporanea di cultura viva (peste bovina, mal rossino) e che, senza suscitare notevoli manifestazioni morbose, conferisce una immunità durevole, debba ricadere per una certa parte nel dominio della immunizzazione coi tossoni ».

Val quanto dire che se, invece di impiegar veleni sviluppati in mezzi così artificiali come i brodi, si facesse la cultura in substrati il più possibilmente vicini a quelli del corpo o nel corpo direttamente, si dovrebbe veder formare di tossoni, di questi prodotti atossici immunizzanti diretti della cultura, una quantità molto maggiore e forse esclusiva: altrimenti la guarigione spontanea delle malattie infettive sarebbe appena possibile, se ogni prodotto immunizzante dovesse prima nel corpo passare per lo stadio di tossina in piena attività, come succede per i tossoidi.

Raccogliendo quanto siamo venuti enumerando, abbiamo che Ehrlich nella cultura difterica ha potuto distinguere sei varietà di tossina, cinque di tossoidi, una categoria complessa di tossoni e lascia sospettare che esistano tuttora composti non caratterizzati e variabili a seconda delle condizioni di cultura. Tossina, tossoidi e tossoni assorbono tutti antitossina, e quindi un cmc. di siero normale deve contenere non solo 100 « gruppi combinabili » per neutralizzare le 100 dosi mortali di tossina, ma anche altri gruppi, in numero presso a poco eguale, secondo i calcoli di Erhlich, per saturare gli altri prodotti atossici secondari: in tutto 200 « gruppi combinabili », il doppio di quanto si richiederebbe se si trattasse di tossina pura.

Polivalenza

La polivalenza dei vaccini e dei sieri, offre già un numero talmente rilevante ed autorevole di esempi, che Ehrlich non solo la accetta, ma cerca anche di inquadrarne la spiegazione nell'ordine di idee che sopra abbiamo esposto. Dice infatti:

« Nelle tossalbumine vegetali (ricina, abrina, robina, crotina) si trovano pure sicuri indizi che parlano in favore della presenza di tossoidi. Degno di singolare riguardo mi pare a questo proposito il fatto che l'antitossina prodotta colla robina, la tossalbumina della robinia pseudoacacia, corrisponde per le sue proprietà quasi completamente all'antiricina, nonostante che i corpi che l'hanno prodotta, robina e ricina, sieno sicuramente diversi. *Questi rapporti stanno ad indicare che la così poco velenosa robina rappresenta un tossoide naturale della ricina.* Io non dubito che bisognerà mettersi da questo punto di vista per spiegare la questione così oscura dell'immunità vicariante. Così, per es., è stato dimostrato da Calmette che il siero di animali immunizzati contro il veleno dei serpenti, riesce a neutralizzare anche notevoli quantità di veleno degli scorpioni. Questo fatto rende probabile che anche il veleno degli scorpioni stia a quello dei serpenti nel rapporto di un tossoide ad una tossina, e simile sospetto sarebbe confermato quando anche il siero antiscorpionico dispiegasse azione protettiva contro il veleno dei serpenti. »

Due veleni, adunque, quantunque di proprietà fisiologiche molto diverse, possono darsi reciprocamente l'immunità, quando posseggono in comune la semimolecola aptofora, che è la parte immunizzante, sia qualsivoglia la semimolecola tossofora, che solo importa per la fisionomia speciale del quadro morboso. Come pure non è escluso che la semimolecola aptofora esista da sola (tossoni), ed allora deve succedere che estratti di piante e animali non velenosi dieno vaccini per quelli velenosi, come può essere, per esempio, il caso dell'estratto di tuberi di dalia che riesce attivo contro il veleno de' serpenti.

Tali sono i lavori dell'Ehrlich, di cui ho cercato di riassumere, nella maniera più piana, le proposizioni essenziali, e che l'A. promette di arricchire con ulteriori contributi: lavori che, per poco che si sia addentro in questo genere di studî, colpiscono vivamente per la loro profondità, come per la lucida spiegazione che offrono ai più ardui quesiti dell'immunità. Si può certamente dissentire dall'A. su alcune interpretazioni teoriche, specie su quelle in riguardo alla genesi dell'antitossina nel corpo, che pure rispondono a molti dati di fatto; ma resta sempre col suo pieno valore la parte maggiore del lavoro, quella che analizza i principii attivi nelle culture, la quale è tutta a base di sperimenti, e di sperimenti ammirevoli, sia pel materiale e il tempo, certamente incalcolabili, che ha costato l'erezione delle formole e delle grafiche le più complicate; non meno che per la finezza nel raccogliere il risultato sperimentale, col solo mezzo di esame possibile in questi casi, la prova biologica, orientandosi in un labirinto di

composti mescolati nella stessa cultura, soggetti a continue reazioni reciproche e dotati di caratteri ancora così oscuri e delicati.

Studi di Emmerich e Löw

« La ragione, per la quale in molte colture batteriche, nonostante la presenza di sufficiente ed appropriato materiale nutritivo, lo sviluppo a poco a poco viene a cessare, sta nella presenza, già dagli AA. fatta rilevare, di un enzima, prodotto dai batterii stessi e che poi finisce per dissolverli.

« Esistono enzimi batteriolitici capaci di dissolvere, non solo la propria specie batterica ma altresì diverse altre specie, anche patogene.

« Poichè questi enzimi batteriolitici sono capaci di dissolvere anche nel corpo animale i batterî patogeni, si può ricorrere ad essi per intervenire nella guarigione delle malattie infettive. Così si riesce facilmente e sicuramente, per mezzo dell'enzima del bacillo piocianeo di guarire una infezione carbonchiosa mortale in 10 ore. Un cmc. di soluzione di questo enzima scioglie in vitro completamente entro 12-24 ore dei milioni di batterî della difterite, del tifo e del colera, onde l'enzima del piocianeo dovrebbe essere adatto al trattamento di queste malattie infettive.

« Anche il bacillo della peste viene disciolto dall' enzima del piocianeo: è risultato che 1 cmc. di soluzione di enzima in poche ore riusciva ad uccidere e a disciogliere completamente più di 30 milioni di bacilli pestiferi. Onde gli AA. raccomandano, con questo enzima del piocianeo, di praticare esperienze curative su animali infettati di peste, e credono, in base ai risultati ottenuti sul carbonchio, che queste esperienze saranno positive e che l'enzima del piocianeo potrà essere impiegato anche nella cura della peste umana.

« E poichè gli enzimi batterici nel corpo animale vengono abbastanza presto distrutti, così, se si riesce con poche iniezioni di essi facilmente a guarire le malattie infettive, non si trovano invece adatti pel trattamento preventivo. Tuttavia agli AA. è riuscito di combinare in vitro l'enzima con una albumina animale in modo di avere una molecola complessa, che si conserva nel corpo animale e perciò è adatta alla immunizzazione. Con questa combinazione dell' enzima del piocianeo gli AA. hanno, infatti, immunizzato dei conigli contro il carbonchio e delle cavie contro la difterite.

« Gli AA. credono che il principio attivo dei sieri immunizzanti non sia rappresentato da altro che da una combinazione dell'enzima specifico con un corpo albuminoide animale, e la cosiddetta agglutinazione non sia che il primo stadio della dissoluzione dei batterî per opera di questa combinazione dell' enzima.

« E, a questo riguardo, dagli esperimenti degli AA. è risultato che il diverso modo con cui i sieri immunizzanti si comportano in vitro e nell' animale, di fronte ai batterî patogeni specifici, proviene dall' essere o no presente nella mescolanza ossigeno gassoso. Se nelle esperienze in vitro questo ossigeno viene escluso, i batterî patogeni specifici vengono non solo agglutinati, ma

ben anche uccisi e sciolti in vitro, come hanno fatto vedere le esperienze praticate col bacillo colerico e col tifoso ».

In sostanza, qui l'Emmerich afferma:

1. La *polivalenza* nel senso più esteso della parola, ciò che nell' A. non è nuovo, avendo egli, in esperienze già remote, notato alcune corrispondenze, si pei vaccini (1886 e 87) come pei sieri (1894), fra lo streptococco dell' eresipela, il carbonchio, la tubercolosi e un microbio virulento del terreno.

2° la possibilità—e qui è l'interessante—di *trarre direttamente dalle culture dei prodotti curativi*;

3° il bisogno di *introdurre nelle culture elementi naturali* per migliorare la costituzione e la resistenza dei vaccini in esse prodotti. Sullo stesso ordine di idee l'A. aveva già immaginato (1894) la formazione della Immunproteina, combinazione di un prodotto batterico e di albumina attiva, ma che aveva luogo nell'interno dell'organismo.

RIVENDICAZIONI

E. Centanni. L' immunizzazione specifica degli elementi dei tessu i. *Riforma medica*, luglio 1893.—*Deut. med. Wochenschrift*, n. 41 e 45, 1893.

E. Centanni e A. Bruschettini. Sui vaccini polivalenti. 1ª comunicazione. Un vaccino per varie malattie batteriche del coniglio. *Riforma medica*, aprile 1895.

E. Centanni e A. Bruschettini. I vaccini polivalenti. 2ª comunicazione. La polivalenza nelle infezioni non batteriche e nelle intossicazioni comuni. *Riforma medica*, settembre 1895.

E. Centanni. La depurazione dei vaccini a scopo curativo. 1ª comunicazione. Concetto generale della depurazione. *Policlinico*, volume III-M, 1896.

E. Centanni. Sui vaccini depurati (stomòosine). 2ª Memoria. La stomòosina dello pneumococco. *Riforma medica*, settembre 1897. *Arch. ital. de biologie*, déc. 1897.

In questi cinque lavori, tutti di data precedente ai citati di Ehrlich e di Emmerich, e alcuni di non poco, ho sviluppato uno speciale indirizzo di ricerche sull' immunità, che, raccolto sotto la dottrina delle stomòosine, si appoggia a questi tre punti fondamentali:

1° *Esistono nelle culture dei prodotti immunizzanti atossici di azione rapida e curativa, non derivati da scomposizione della tossina, ma generatisi primitivamente come tali.*

2° *Questi prodotti agiscono non direttamente sull' agente patogeno, ma sulle cellule sensibili saturandone l' affinità specifica verso tale agente e rendendole così inattaccabili ad esso.*

3° *Esistono dei principii dotati della proprietà di proteggere l'organismo ad un tempo contro un numero considerevole dei più svariati agenti patogeni.*

Queste conclusioni, quantunque tutte appoggiate validamente da esperimenti e da nessun lato direttamente contraddette, pure, per trovarsi quasi del tutto isolate nell'attuale movimento scientifico, hanno sollevato alcune incertezze sul loro apprezzamento definitivo. Ebbene, ecco due nomi dei più eminenti nella scienza

e dei lavori sperimentali colle migliori garanzie, che portano a quelle conclusioni la più piena e solidale conferma!

Che cosa sono, infatti, i tossoni dell'Ehrlich e, se si vuole, i fermenti dell'Emmerich, se non le stomòosine, quali sono stabilite con tutta chiarezza nei miei lavori? E l'idea direttrice della teoria di Ehrlich, la saturazione della Seitenkette dei tessuti con l'aptofora del veleno, non è la ripetizione sostanziale della immunizzazione specifica degli elementi dei tessuti, a cui ho dedicato tutto un lavoro sei anni fa, nel pieno imperversare delle idee tutte opposte del Behring? E non sono due autori della scuola tedesca, così attaccata alla specificità, che ammettono la polivalenza dell'immunità nel senso più ampio della parola?

Anche dai rapidi cenni sopra riportati dei lavori di Ehrlich e di Emmerich, chi ha seguito i miei lavori deve essersi facilmente accorto in quanti punti essi vengono, specialmente con quelli dell'Ehrlich, a toccarsi e non di rado a confondersi. V'hanno per ognuno, è vero, diversità in quanto all'indirizzo sperimentale e ad alcune interpretazioni dei fatti; ma, astraendo dall'interesse generale delle ricerche, pregevolissimo in ogni caso, e stando alle conclusioni speciali prese di mira, non è difficile stabilire chi meglio le corrobora con dati sperimentali più diretti e più completi.

a) *Confronto dei dati sperimentali.*

Rimandando, per i maggiori particolari, agli originali dei lavori, qui basterà brevemente osservare:

al 1°. Per dimostrare l'*origine primitiva* dei tossoni Ehrlich si serve di reazioni in mezzo a colture che contengono già veleno, ed in queste condizioni non si può mai assolutamente escludere che, per qualche modificazione precoce e non controllabile, anche i tossoni provengano, come i tossoidi, dal veleno, con che si ricade nella vecchia idea dei vaccini attenuati. Io, al contrario, mi sono servito di culture conservate, o costantemente o per lungo tratto, in istato di completa atossicità (pneumococco, rabbia, difterite), approfittando appunto di quello in cui confida anche l'Ehrlich, della cultura in substrati nutritivi naturali.

Nè credasi pura sottigliezza teorica il considerare il principio vaccinante come primitivo o come secondario, perchè non è punto in differente, nel preparare una cultura vaccinale, il cercare di spingere al massimo la produzione del veleno come utile eccitante, o il cercare invece di eliminarlo del tutto come un complicante sempre nocivo; e nemmeno è indifferente, nel vaccinare un animale, di stancarlo con una serie di avvelenamenti ripetuti, o di saturarlo invece d'un tratto colla dose massima del principio vaccinale già preparato.

al 2°. Per l'*immunità dei tessuti* o istogena l'Ehrlich si serve dell'idea, non completamente dimostrata, che la Seitenkette del siero provenga dai tessuti, laddove io mi sono appoggiato ad una serie di prove dirette, quali: che l'immunità può esistere senza un potere dimostrabile nel sangue; che la sostanza immunizzante si trova un certo momento più abbondante nell'organo sensibile al virus che nel circolo; che i germi non ri-

sentono effetti diretti dai sieri immuzzanti, ma solo dopo che questi sieri sono stati assorbiti dall'organismo; che dove si deposita la sostanza immunizzante si forma una chiazza locale più immunizzata che il resto del corpo, e così via.

L'unicitá di localizzazione, fra immunità e intossicazione, negli elementi dei tessuti che fa la base della mia teoria, è stata sanzionata dall' Ehrlich con una bella formola, ammettendo per i due processi una base unica, che sia appunto la stessa semimolecola tossica quella che stabilisce e l'intossicazione e la immunità. Ma questa idea della saturazione dell'elemento sensibile delle cellule con un elemento attivo del vaccino, è stata già da me fissata nel termine *stomóosina*, che, secondo l'etimologia greca, vuol dire ad un tempo, chiudere un'apertura, cioè quella della catena molecolare, e dare la tempra, cioè, dopo quella chiusura, l'elemento è inattaccabile al veleno. Ed io credo che la mia parola abbia maggior diritto di restare nella scienza della parola tossone, che Ehrlich impiega per una sostanza che non è stata mai veleno e che non ha nessun ufficio di veleno.

al 3°. Se la *polivalenza* delle sostanze immunizzanti non offre più discussione quanto alla sua esistenza, ha bisogno ancora di essere illustrata quanto al suo meccanismo, senza di che non è possibile trarne tutti i frutti di cui è capace. E qui abbiamo tre idee: *a)* quella sopra avanzata dall'Ehrlich, per cui i due veleni hanno in comune la semimolecola aptofora; *b)* quella dell'esistenza di un principio tossico comune a molti batteri, la proteina del Buchner o la pirotossina da me studiata; *c)* quella che l'azione antagonista sia esercitata non contro il veleno primitivo, ma contro i veleni secondari sviluppati dai tessuti alterati del primitivo, e di carattere differente e più generico.

La prima ipotesi deve avere poca applicazione, perchè di polivalenza estesa è marcata fra veleni nettamente specifici non possiamo citar facilmente esempio. La seconda deve pur essa restar limitata, perchè, proseguendo le mie ricerche sulle pirotossine, ho trovato che questi veleni non sono generali, si possono anzi preparare culture virulentissime del tutto atossiche, pur restando fornite di alto potere immunizzante e polivalente. I miei studi mi hanno condotto ad emettere (1) e mantenere la terza ipotesi, colla quale si interpreta facilmente quanto ho riferito nei miei lavori sulla polivalenza: come questa si eserciti fra agenti i più disparati; come rimanga limitata ad un piccolo numero di dosi mortali; come non si riesca affatto o solo in legger grado ad eliminare lo sviluppo del focolaio locale, ma, più che altro, ad opporsi alla diffusione generale; come l'effetto appaia più spiccato per gli agenti che operano con considerevole periodo di incubazione, cioè sviluppando molti di questi veleni secondari ecc. ecc.

Una differenza essenziale fra le mie idee e quelle dell'Ehr-

(1) E. Centanni. Sul valore immunizzante dell'infiltrato locale nelle malattie infettive. *Gazzetta degli ospedali*, N. 106, agosto 1898.
E. Centanni. Sui prodotti tossici secondari nelle infezioni. *Riforma medica*, settembre 1898.

lich — non dell'Emmerich e del Knorr potrebbe riscontrarsi nel mettere che l' Ehrlich fa in una categoria tutta a parte le sostanze immunizzanti del siero, le quali sarebbero, e per origine (Seitenketten dei tessuti) e per funzione (immunità ematogena), sostanzialmente differenti da quelle generate nelle culture. Questa differenza ha una base non troppa solida, perchè della origine dell' antitossina nel corpo Ehrlich dà una teoria, ma nessuna prova, e una teoria anzi — quella della iperrigenerazione delle Seitenketten — che è il punto più arduo di tutto il suo sistema; d' altra parte, vi sono molti dati contrari all'ammettere che nel corpo siero e veleno si neutralizzino direttamente e non piuttosto anche essi per l'intermezzo dei tessuti.

Credo, tuttavia, che questa, in apparenza, inconciliabile questione di sostanze generate nel corpo e generate nella cultura, potrà trovare un punto d'incontro, quando le culture vaccinali saranno preparate, come io fo, in terreni naturali, e non piuttosto in brodi, ove l'evoluzione chimica dei principii della cultura non può essere, in confronto dello sviluppo nel corpo, che necessariamente difettosa e incompleta; e quando, inoltre, si conosceranno per le culture dei sistemi di depurazione più perfetta.

Del resto, non ho mai negato che sostanze immunizzanti si possano produrre per altra via che quelle delle culture; a me basta che sia stabilito che sostanze immunizzanti atossiche primitive si trovino nelle culture, e questo Ehrlich lo ammette pe' suoi tossoidi ed Emmerich pe' suoi fermenti; che queste sostanze possano agire rapidamente come i sieri, e questo Ehrlich l'ammette pe' suoi prototossoidi ed Emmerich pe' suoi enzimi. Stanno i fatti, le interpretazioni verranno poi.

b) Tre categorie di principii immunizzanti.

Buona parte degli insuccessi e dei contrattempi provati nella applicazione della terapia immunizzante, trova la sua sorgente principale nella credenza assai diffusa che il principio attivo nell'immunità sia unico, quello, cioè, che si incontra nei sieri, come sono comunemente preparati. Abbiamo visto, invece, quanto il problema sia di gran lunga più complesso, e come non sarà così presto districato dal più insistente studio scientifico e tanto meno da quello che tira all'immediato successo pratico. Di questi principii, intanto, ne abbiamo imparato a conoscere tre categorie principali con molte varietà sottoposte, ogni categoria ha la sua indicazione precisa in un dato momento della malattia, e non può venir sostituita, a qualsiasi dose, col mezzo delle altre.

La *prima categoria* è data dai corpi che hanno il potere di fissarsi durevolmente sui tessuti (mie ischo-stomòosine, tossoidi e tossoni di Erlich e, probabilmente, enzima albuminato di Emmerich), che sono in realtà gli agenti attivi essenziali delle immunità durature dopo superate le malatti.e

A questi corpi spetta il più grande avvenire in casi di malattie endemiche e di epidemie tenaci per praticar la immunizzazione preventiva, che è l'unica difesa veramente utile per questi casi, dove i sieri hanno dato davvero prove poco felici, perchè come preventivi sono troppo effimeri, e come curativi arrivano troppo spesso in ritardo. E, d'altra parte, i vaccini virulenti che potrebbero in questi casi rendere buoni servigi (il

jenneriano nell'uomo, l'anticarbonchioso negli animali), risultano troppo facilmente, coi metodi di preparazione attuale, o poco attivi o, sopratutto in riguardo all'uomo, troppo pericolosi; oltrechè sono per loro natura troppo lenti, quando trattasi d' epidemie molto invasive già in corso.

La *seconda categoria* è data dalle sostanze che passano comunemente nei sieri, e di cui abbiamo visto la possibilità di produzione anche fuori del corpo: esse hanno la proprietà di agire nella immediata vicinanza della infezione, o poco prima o poco dopo, ma dopo solo nel caso o che nessun sintoma sia ancora comparso, o sia comparsa solo quella parte dovuta ad una frazione della minima dose mortale.

Anche impiegati nella cura, questi prodotti conservano l'originario carattere squisitamente preventivo, e appena anche una sola dose mortale di tossina si è combinata ai tessuti, combinazione che, per giunta, nel primo momento è silenziosa, essi, a qualsiasi dose somministrati, riescono senza effetto.

Si vede, dunque, quanto sia ristretto e quanto in pratica sfugga facilmente il momento più opportuno per applicare con frutto quei sieri, sui quali, al loro comparire, si erano accumulate così potenti speranze, e che in pratica hanno risposto così poco, appunto perchè si è preteso di applicarli fuori dei limiti loro assegnati.

La *terza categoria* è data dagli agenti di carattere più generico e che neutralizzano i veleni secondari; la sua azione comincia quando quella delle due categorie precedenti e già cessata, cioè quando il veleno specifico combinatosi coi tessuti ha finito di esistere come tale, e sono già entrati in scena i prodotti di alterata funzione e di disgregamento cellulare, di natura e di effetti in tutto differenti dall'agente tossico primitivo.

Contrariamente a quanto si è attribuito alle antitossine specifiche, spetta agli agenti di questa categoria un ufficio importante, e in certi casi forse esclusivo, nel meccanismo della guarigione naturale. Impiegati a malattia sviluppata, ci permettono di intervenire in un'epoca un poco più avanzata che coi prodotti specifici, e, nelle forme non troppo gravi, di fare anche a meno di questi; valgono altresì a correggere la troppa specificità dei sieri, per la quale essi divengono in certi casi persino inservibili, com' è, p. e., per lo streptococco.

Era questo un punto poco considerato o nascosto sotto il nome vago di «forze risolutive naturali», quando io vi richiamai l'attenzione e ne mostrai l'interesse, (1) e vi ritornerò in un prossimo lavoro, essendo riuscito con nuovi esperimenti a dissociare un po' meglio il modo d'agire dei prodotti di questa terza categoria da quello delle precedenti. L'argomento però è molto complesso.

Tanto io doveva dire, perchè ai miei studi, ora che le idee in essi da anni faticosamente propugnate cominciano ad avere il loro corso, non venga almeno nella scienza a mancare il posto a cui hanno diritto.

(1) E. Centanni. Sul valore immunizzante dell'infiltrato locale etc. Sui prodotti tossici secondari etc. (Loco citato).

Abbiamo visto come gli ultimi lavori dell'Ehrlich e dell'Emmerich, e altri simili se ne potrebbero raccogliere nella letteratura, sono completamente favorevoli al mio indirizzo, non solo, ma le mie ricerche si trovano ancorain alcuni punti considerevolmente più innanzi.

E così, se le grandi difficoltà scientifiche, in congiura colle maggiori privazioni materiali, non hanno permesso a questi studi di avanzare con ogni speditezza, non hanno tolto ad essi nemmeno tutto il vantaggio di aver posto, molto per tempo, il piano di ricerche da un punto di vista molto favorevole per meglio apprezzare al suo valore quanto si veniva producendo, e per cercare di porre riparo ad alcune delle deficienze maggiori.